

TWO-STAGE METHOD FOR COATING ANTIBODY ON SOLID PHASE

Patent number: JP6066803 **Also published as:**
Publication date: 1994-03-11 EP0575998 (A)
Inventor: RESURII OTSUPENHAIMAA; RUISU AARU US5399500 (A)
POORATSUKU EP0575998 (B)
Applicant: BECTON DICKINSON CO CA2098549 (C)
Classification:
- **International:** G01N33/543; G01N33/543; (IPC1-7): G01N33/547;
G01N33/543
- **European:** G01N33/543; G01N33/543M
Application number: JP19930155453 19930625
Priority number(s): US19920906213 19920626

[Report a data error](#)

Abstract of JP6066803

PURPOSE: To obtain a stabilized surface of a basic material coated with a secondary antibody bonded with a primary antibody by touching a basic material previously coated with the secondary antibody to the primary antibody bonded specifically with the secondary antibody together with a block agent.

CONSTITUTION: A secondary antibody is touched, at first, to the surface of a basic material which can be bonded with the secondary antibody and the basic material is coated with the secondary antibody. A primary antibody to be bonded specifically with the secondary antibody, a block agent and a stabilizer, as required, are then touched to the basic material which is thereby coated. Consequently, the nonspecifically bonded part is blocked to produce a stabilized surface of the basic material. The primary antibody includes a polyclonal antibody for antigen and steroid, cardiotonic glucoside, etc., as monoclonal antibody. The secondary antibody is a polyclonal or monoclonal antibody for the primary antibody. Preferably, the basic material is a test tube and the concentration of the primary and secondary antibodies is set, respectively, at 0.5-6 μ g/ml and 5-20000ng/ml. Preferably, the block agent is a protein, bovine serum albumin, etc., and employed by 0.1-50mg/ml.

Data supplied from the esp@cenet database - Worldwide

(19)日本国特許庁 (JP)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平6-66803

(43)公開日 平成6年(1994)3月11日

(51)Int.Cl.⁵
G 0 1 N 33/547
33/543

識別記号
G 0 1 N 33/547
Q 9217-2 J

府内整理番号
9015-2 J

F I

技術表示箇所

審査請求 有 請求項の数10(全 11 頁)

(21)出願番号 特願平5-155453

(22)出願日 平成5年(1993)6月25日

(31)優先権主張番号 9 0 6 2 1 3

(32)優先日 1992年6月26日

(33)優先権主張国 米国(US)

(71)出願人 591007332

ベクトン・ディッキンソン・アンド・カン
パニー

BECTON DICKINSON AN
D COMPANY

アメリカ合衆国ニュージャージー州07417
-1880, フランクリン・レイクス, ワン・
ベクトン・ドライブ (番地なし)

(72)発明者 レスリー・オッペンハイマー

アメリカ合衆国ニュージャージー州07405,
キネロン, セダー・トレイル 5

(74)代理人 弁理士 湯浅 恭三 (外6名)

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 固相へ抗体をコーティングするための2段階法

(57)【要約】

【目的】 本発明は、基材上に抗体をコートするため
の、2段階からなる方法を提供する。

【構成】 一次抗体に対する二次抗体を基材上にコート
し、次に、ブロック剤および安定剤の存在下で一次抗体
をコートする。

【特許請求の範囲】

【請求項1】(i) 二次抗体を、該二次抗体に結合することができる基材表面に接触させることにより二次抗体でコートされた基材を形成し；そして(ii) 上記二次抗体でコートされた基材を、上記二次抗体が特異的に結合する一次抗体にブロック剤と共に接触させる工程からなる、基材上への抗体のコーティング法。

【請求項2】基材がプラスチック試験管である、請求項1記載の方法。

【請求項3】上記二次抗体が約0.5から約6μg/m¹の濃度を有する、請求項1記載の方法。

【請求項4】上記一次抗体が約10から約500ナノグラム/m¹の濃度を有する、請求項1記載の方法。

【請求項5】上記ブロック剤が、ウシ血清アルブミン、ゼラチンおよびカゼインからなる群から選択される、請求項1記載の方法。

【請求項6】上記ブロック剤が約1.0mg/m¹から約50mg/m¹の濃度のウシ血清アルブミンである、請求項5記載の方法。

【請求項7】請求項1に記載の方法により一次抗体に結合した二次抗体でコートされた基材からなるイムノアッセイに使用されるのに適した製品。

【請求項8】一次抗体に結合した二次抗体でコートされた基材が競争アッセイに使用するのに適している、請求項1記載の方法。

【請求項9】一次抗体に結合した二次抗体でコートされた基材がサンドイッチアッセイに使用するのに適している、請求項1記載の方法。

【請求項10】一次抗体に結合した二次抗体でコートされた基材がRIAに使用するのに適している、請求項1記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】本発明は、抗原のアッセイのために基材上に抗体をコーティングする方法に関する。

【0002】

【従来の技術】イムノアッセイは免疫化学手段により抗原または抗体を定量するのに使用される。通常、量を変化させた抗原または抗体のいずれかを、一定量のそのいずれか他方に加えて抗原-抗体複合体を形成し、量を変えた方の反応物の標準曲線により示される、量を変えた方の反応物の函数として該複合体の形成を測定する。次に、未知量の量を変えた方の反応物の反応を標準曲線に適用して比較可能な変化を生じる、量を変えた方の反応物の量を測定することができる。

【0003】抗原-抗体複合体は溶液中で形成してよく(均質アッセイ)、または反応物の一方を固体支持体に結合することができる(不均質アッセイ)。通常、不均質アッセイは非複合体形成物質を除くために洗浄工程を利用する。本発明は、不均質アッセイのみに関する。

【0004】イムノアッセイにおいては、抗体または抗原のいずれか一方を最初に固体支持体、例えばプラスチック表面またはビーズに結合させることにより、固相イムノアッセイと呼ばれるイムノソルベントアッセイ中の未反応の物質からの抗原-抗体反応生成物の分離を促進する。本発明は、固体支持体への抗体の付加に関する。

【0005】固相イムノアッセイにおいては、さまざまな基材、例えばフルオロクローム、アイソトープまたは酵素を用いて、例えば蛍光イムノアッセイ(FIA)、ラジオイムノアッセイ(RIA)、イムノラジオメトリックアッセイ(IRMA)、酵素イムノアッセイ(ELISA)、およびビオチン-アビシン系において抗原-抗体を検出するための手段として抗原または抗体を標識してきた。抗原または抗体を人工膜に取り込むことにより反応の検出を促進するための不活性試薬としてリポソームも使用されてきた。

【0006】固相イムノアッセイの調製において抗体を固相にコーティングするための幾つかの方法が工夫されてきた。もっとも単純な方法は、非特異的に正しく配置されていない様式で直接固相表面に一次抗体をコートする、1段階工程である。この1段階で抗体をコートされた表面を次に抗原アッセイのために使用する(例えば、カット(K. J. Catt)ら、Nature, 213, 825(1967)を参照)。

【0007】抗体を抗原に接触させた場合、イムノアッセイのための上記調製法における純化(refinement)は、最高のアッセイ感度のための一次(捕捉)抗体の正確な配置である。これは、抗原結合部位に遠位の一次抗体に結合することができる二次抗体の使用により達成された。

【0008】二次抗体は親和性により精製され、そして一次抗体に対してFc特異的であってよい。イムノグロブリン(Ig)モノマーのFc部分は、Y型のIg分子の幹(stem)に対応し、そしてひとつ以上のジスルフィド結合により結合した2つの重鎖のC末端部分からなる。Fc特異性により、抗原のイムノアッセイのための最良のFab配置で一次抗体が二次抗体に結合する。IgのFab部分は、重鎖のN末端にジスルフィド結合した軽鎖、即ち、Y型分子の2つの突出部分(limb)からなる。

【0009】多段階のコーティング法において、表面は、一次抗体に対する抗体である二次抗体で予め最初にコートされていてよい。次に、この予めコートされた表面を抗原に対する一次抗体でコートし、そしてこの2つのコートされた表面を抗原のアッセイに使用する。この種の方法は、例えば、米国特許第4,092,408号および第4,166,844号において、および、サンコリ(G. M. Sankoli)らの「抗IgG Fcイムノグロブリンの前処理によるマイクロリットルウ

エルの抗体結合特性改良法」、J. Imm. Met. h., 104, 191-194 (1987) に記載されている。二次抗体および一次抗体のコーティングは、1段階の共コーティング法 (cocoating) により2つの抗体を混合して単純化してもよい。

【0010】固相へのコーティングをイムノアッセイにおいて使用する場合、固相の未コート領域への非特異的結合がアッセイの正確さ、精度または感度を干渉し、そして高いバックグラウンドおよび間違った読みをもたらすかもしれない。ブロック剤は非特異的結合部位をブロックするために分離コーティング工程において使用された。ウシ血清、アルブミン、ゼラチン、カゼインおよび他の基質はブロック剤として使用されてきた。このブロック工程は後コート (postcoat) と呼んでよい。一次抗体が固相に適用された場合は、慣用的に後コーティング工程が行われてきた。この場合、単なる一次抗体のコートおよびブロック剤の後コートを含む2段階法；または二次抗体の前コート、一次抗体のコート、およびブロック剤の後コートからなる3段階法でありうる。前コート工程およびコート工程を組み合わせれば（共コート）、2段階工程は二次抗体および一次抗体を用いる共コートにより第1工程となり、そしてブロック剤後コートは第2工程となる。

【0011】

【発明が解決しようとする課題】異なる配置の工程を用いた優秀なコーティング法が今、発見された。

【0012】本発明の目的は、最小の工程数と最適に配置された捕捉抗体を用いた、有効なコーティング法を提供することである。

【0013】本発明の他の目的は、ダイナミックレンジの増加したイムノアッセイを提供することである。

【0014】本発明のさらなる目的は、一次抗体の精製の程度を最小にすることである。一次抗体は、既に基材上にある二次抗体に直接結合しているため、混入している蛋白質と結合部位に関して競争する必要がない。

【0015】本発明のさらなる目的は、慣用的コーティング法にまさるようにアッセイ感度を改良することである。慣用的な共コート-後コート法または前コート-コート-後コート法に比べてダイナミックレンジが改良される。

【0016】一次抗体の最小限の使用も本発明の他の目的である。

【0017】

【課題を解決するための手段】したがって、二次抗体をコートされた基材を形成するために、二次抗体を結合することができる基材表面に二次抗体を最初に接触させることにより基材上に一次抗体をコートするための方法が提供される。次に、二次抗体をコートされた基材を、該二次抗体が特異的な一次抗体、ブロック剤、および必要であれば、安定剤に接触させ、それによって、非特異的

結合部位がブロックされている、一次抗体に結合した二次抗体でコートされた安定な基材表面が提供される。

【0018】有利なことに、そして期待に反して、最小限の工程を利用し、そして最小量の一次抗体を必要とするこの新しいコーティング法は感度が改良されている。したがって、この方法は特に工業的応用において有用である。

【0019】本発明のより良い理解のために、具体例を以下に記載するが、その範囲は特許請求の範囲により指摘される。

【0020】本発明は、固相イムノアッセイに使用される、抗体をコートされた基材の製造法を提供する。

【0021】本明細書において以下のことが理解される：コーティングは表面への一次抗体の直接の適用である。前コーティング (precoating) は支持体への二次抗体のコートの適用である。共コーティング (cocoating) は同時に2つ以上の抗体を同じ部位に適用することである。後コーティング (postcoating) は慣用的には分離した工程であり、かつ、抗体をコートされた表面へのブロック剤の適用である。

【0022】支持体上にコートされる一次抗体の例としては、興味のある抗原に対するポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体である。ステロイド、例えば、テストステロン、アンドロステロン、プロゲステロン、エストロン、エストラジオール、エストリオール、デオキシコルチコステロン、コルチソル、コルチソン、アルドステロン等；カルジオトニックグリコシド、例えば、ジゴキシン、ジギトキシン、オウアバイン、デスラノシドおよびそれらのアグリコン；ホルモン、例えば、甲状腺刺激ホルモン (TSH)、T₄ および T₃；ビタミン、例えば、B, C, E, K および葉酸等；生物学的活性分子、薬剤およびそれらの代謝物；病原体；および毒素または他の抗原が興味あるものである。通常は競争フォーマットによりアッセイされる小さい分子（例えば、T₄、T₃ 吸収 (uptake)、ジゴキシン、テオフィリン）、および通常はサンドイッチアッセイによりアッセイされる大きい分子（例えば、甲状腺刺激ホルモン）の両方に本発明の方法が適用されること、本発明の利点でもある。

【0023】二次抗体は一次抗体に対するポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体である。

【0024】一次抗体および二次抗体を生産する方法は当業界においてよく知られており、さらに説明の必要はないであろう。抗体は親和性により精製されたものでも、未精製のものでもよい。

【0025】抗体がコートされる表面はさまざまな材料のいずれかであってよい。当業界においては公知であるとおり、そのような材料にはポリマー、例えば、ポリスチレン、ポリエチレン、ポリプロピレン、ポリテトラフ

ルオロエチレン、ポリアミド、ポリアクリルアミド、ポリビニルクロリド等；ガラス、細菌細胞；イオン交換樹脂を含む。このような固体キャリアーは当業界においては公知であり、さらに説明の必要はないであろう。表面基材はシート、フィルム、固体粒子、チューブ、カップまたは試験管であってよいが、試験管が好ましい。もっとも好ましいのはポリプロピレンまたはポリスチレンの試験管である。

【0026】緩衝液は分子の生理的活性を維持するため用いられ、当業界においては公知である。緩衝液は、例えば、炭酸塩、ホウ酸塩、トリス(Tris)、グリシンおよびリン酸緩衝塩(PBS)を含んでよい。

【0027】二次抗体の濃度は、約0.5-6.0 μg/ml、好ましくは1-4 μg/ml、最も好ましくは1-2 μg/mlであってよい。二次抗体は精製されていないか、またはいくらか精製されている1gG画分であります。すべてのクラスのイムノグロブリンを使用できるが、IgGが好ましい。IgGのFc断片に対する親和精製された血清がもっとも好ましい。

【0028】一次抗体は特別な処理を必要とせず、そして約5ng-約20,000ng/ml、好ましくは約20-3,000ng/ml、最も好ましくは約20-200ng/mlの濃度で使用してよい。

【0029】ブロック剤は蛋白質、ウシ血清アルブミン、ゼラチン、またはカゼインを含んでよい。好ましいブロック剤は約0.1-50mg/ml、好ましくは約0.25-25mg/ml、最も好ましくは1-10mg/mlの濃度のウシ血清アルブミン(BSA)溶液である。

【0030】BSA溶液と共にポリオール溶液を使用することが好ましい。ポリオールは抗体の温度安定性を高めると信じられている。通常、砂糖、例えば、デキストロースまたはグリコールがこの容量で用いられており、それらの使用法については他に詳細に説明する必要はない。デキストロースのような砂糖は約0.1-100mg/ml、好ましくは約2-100mg/ml、最も好ましくは10-50mg/mlの濃度で使用してよい。

【0031】本発明は、基材に二次抗体を前コートし、つぎにブロック剤および必要であればポリオールと混合して一次抗体をコートする2段階コーティング法を利用する。前コートは、約18℃から約24℃、好ましくは約20℃から約22℃において、約6時間から約24時間実施してよい。例えばBSAおよびデキストロースを伴う一次抗体のコーティングは、約18℃から約24℃、好ましくは約20℃から約22℃において、約16時間から約24時間実施してよい。30から60%の相対湿度(RH)が好ましいが、40±5%が好ましい。従来のコーティング法と比較して、本発明の方法はより少ない工程数ですみ、イムノアッセイにおいて改良された性能を示す。一次(捕捉)抗体は二次抗体にのみ結合

するので、未占有表面領域に関してブロック剤と競争しない。さらに、二次抗体がFc特異的であれば、捕捉抗体は正確な配置(orientation)で結合する。一次抗体は基材の表面に結合できるが、1000倍以上過剰のブロック剤、例えば、BSAとも競争しない。

【0032】上記コーティング法は当業界で公知であり、通常は抗体含有溶液と共に基材表面をインキュベートすることを含むが、それによって抗体は該表面上に固定される。これは室温で実施してよいが、室温より高い温度または低い温度も使用してよい。該コーティング法は濃度依存性である。高い濃度の抗体はコーティング時間を短縮するが、製造工程においては法外なコストになりやすい。

【0033】一つの態様においては、二次抗体を含有する第1溶液をポリプロピレン試験管に適用し、そして約24時間インキュベートして前コートしてよい。上記第1溶液を吸引し、そして5%デキストロースおよび1%BSAを含む、一次抗体を含有する第2溶液を導入し、そして24時間インキュベートする。インキュベート後、二次抗体を吸引し、試験管を乾燥させる。

【0034】本発明は以下の非限定的実施例によりさらに説明する。

【0035】【実施例】

実施例1

IQP/M TSHアッセイを用いたコーティング法の比較

I. コートされたチューブの製造

このコーティング法においては、ポリプロピレンチューブを使用し、すべてのコーティング溶液は100mMリン酸緩衝液(pH 7.50)を用いて作られた。各コーティング工程は通常16から24時間を必要とした。使用した溶液は吸引により除去した。このチューブコーティング法が終了したと同時に、吸湿剤と共にジップロックバッグ(ziplock bag)にチューブを保存した。この方法のスケールアップは成功した。

【0036】A. 標準的コーティング法

以下のとおりに、一次抗体を直接チューブにコートした：親和精製されたヒツジ抗ヒトTSH-β2ポリクローナル抗体1.0 μg/mlでチューブをコートした。

【0037】B. 共コート/後コート

一次抗体および二次抗体を直接チューブに共コートし、次にブロック剤を後コートして抗体でコートされていないチューブの領域をブロックした。RAGGIG(ウサギ抗ヒツジIgGとFc断片に特異的な抗体)2 μg/mlと共に親和精製されたヒツジ抗ヒトTSH-β2ポリクローナル抗体0.1 μg/mlでチューブをコートした。後コートは1%BSAと5%デキストロース

を含んだ。

【0038】 C. 前コート／共コート／後コート

最初に、 $2 \mu\text{g}/\text{ml}$ の R A G G I G (ウサギ抗ヒツジ IgG と Fc 断片に特異的) 二次抗体でチューブをコートした。次に、親和精製されたヒツジ抗ヒト TSH - β 2 ポリクローナル抗体 $0.1 \mu\text{g}/\text{ml}$ でチューブをコートし、次に BSA と 5% デキストロースを含む後コートを行なった。

【0039】 D. 前コート／ブロック剤のコート

最初に、 $2 \mu\text{g}/\text{ml}$ の R A G G I G (ウサギ抗ヒツジ IgG と Fc 断片に特異的) 二次抗体でチューブをコートした。次に、親和精製されたヒツジ抗ヒト TSH - β 2 ポリクローナル抗体 $0.1 \mu\text{g}/\text{ml}$ と 1% BSA ブロック剤を共にチューブにコートした。

【0040】 II. TSH に関する非アイソトープリポソームアッセイ
アッセイ法の原理

この非アイソトープアッセイはリポソームとして知られている人口膜の使用に基づく。リポソームは蛍光染料を取り込み、そして TSH に対する表面一結合モノクローナル抗体で処方される。この試験も異なる TSH 抗原部位を有する抗体でコートされたプラスチックチューブを用いる。TSH の存在下、両方の抗体（即ち、リポソーム上の抗体とプラスチックチューブ上の抗体）は TSH に結合し、固定化サンドイッチを形成する。インキュベート後、未結合のリポソームを除去し、そして結合したリポソームを界面活性剤でリーンスする。カプセル内の染料の放出による蛍光は血清中の TSH 濃度に正比例する。

【0041】 A. リポソームトレーサーの製造

モノクローナル抗ヒト TSH 抗体を消化し、該抗体の F(ab') 断片を N- マレイミドカプロリルリポソーム (MC リポソーム) にカップリングさせる。その結果得られるリポソームストックを次に希釈して、濾過された 0.1 M リン酸緩衝液 (pH 7.5) 中 $1/100$ の力値にする。該緩衝液は $0.8\% \text{ BSA}$ 、 6 mM EDTA 、 $0.2\% \text{ アジ化ナトリウム}$ 、 $5\% \text{ カゼイン}$ および $1\% \text{ グリセロール}$ も含む。リポソームは蛍光染料を取り込む。

【0042】 B. アッセイ法

成分／処方の記載

標準 (standard) は、 $3.5\% \text{ BSA}$ 、 NaCl および防腐剤を含むバルビタール緩衝液から処方される。マトリックス中にスパイクされた h-TSH は凍結乾燥された市販の製品であり、該製品は WHO/MRC

h-TSH として検査されている。 $0.0, 0.3, 2.0, 8.0, 20.0$ および $50.0 \mu\text{IU}/\text{mL}$ TSH を含む標準を標準曲線の作成に使用する。

【0043】 対照は広く試験されている RIA TRAC 7000 シリーズによる。

【0044】 洗浄溶液は 0.15 M 塩化ナトリウム、 $0.1\% \text{ アジ化ナトリウム}$ 、および $0.2\% \text{ BSA}$ をリン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.4) 中に含む。

【0045】 溶解溶液は $0.1\% \text{ cialit}$ を含むルブロール Px の 2.1% 水性溶液である。

【0046】 上記 (1) においてさまざまなコーティング法により製造されたチューブを以下の方法によるアッセイに使用する：

1. コートされたチューブに $200 \mu\text{l}$ の試験試料を加える。

【0047】 2. コートされたチューブに $500 \mu\text{l}$ のトレーサーを加える。

【0048】 3. 反応混合物を 45°C において 2 時間インキュベートする。

【0049】 4. インキュベートの間、反応混合物を 240 rpm で攪拌する。

【0050】 5. インキュベート終了後、反応混合物を吸引する。

【0051】 6. エッペンドルフピペットを用いて 2 ml の洗浄溶液をチューブに加える。

【0052】 7. チューブから洗浄溶液を吸引する。

【0053】 8. 工程 6 および 7 をさらに 2 回繰り返す。

【0054】 9. 洗浄されたチューブに 2 ml の溶解溶液を加える。

【0055】 10. 溶液を含むチューブを激しく攪拌する。

【0056】 11. 5 分間待ち、再び渦巻き攪拌する。

【0057】 12. フルオロメーターで蛍光を測定する。

【0058】 アッセイの要約

試料サイズ $200 \mu\text{l}$

トレーサー体積 $750 \mu\text{l}$

インキュベーション時間 2 時間

40 混合速度 240 rpm

$20.0 \mu\text{IU}/\text{ml}$ の標準の蛍光シグナルを $0.0 \mu\text{IU}/\text{ml}$ 標準でわった比をダイナミックレンジと規定する。結果を表 1 に示す。

【0059】

【表 1】

表 1

コーティング法の比較

コート法	pAb [$\mu\text{g}/\text{mL}$]	ダイナミックレンジ
A 標準コート	1.0	1.2 (2回の実験)
B 共コート／後コート	0.1	4.9 (2回の実験)

C 前コート/共コート/後コート
D 前コート/BSAでコート

定義

標準コート：一次抗体を直接チューブにコートする。
 【0060】共コート：一次抗体および二次抗体を共に同時にチューブにコートする。
 【0061】後コート：抗体でコートされていない部位をブロック剤でブロックする。
 【0062】前コート：一次抗体をコートする前に二次抗体をチューブに予めコートする。
 【0063】コート：一次抗体をチューブの表面に塗る。
 【0064】リンス：抗体を含まない緩衝液。
 【0065】実施例2

ダイナミックレンジに対するブロック剤の連続コーティ

コート法	ダイナミックレンジ
A. 前コート/コート/リンス (BSAなし)	15. 1
B. 前コート/コート/後コート	14. 2
C. 前コート/コート (BSAなし)	13. 0
D. 前コート/BSAでコート	27. 8

結果が示すことは、本発明の2段階工程の一次抗体コーティング工程（前コート/コート）におけるBSAの添加はダイナミックレンジに対して顕著な影響を有することである。後コートにおけるBSAの添加は、しかしながら、ダイナミックレンジの増加にはほとんど利益をもたらさなかった。

【0067】実施例3

実施例1（I）（D）において記載されたとおりの本発明の前コート/コート法を使用して作られたチューブは、IRMAフォーマットによりRIAトレーサーを用いて評価された。RIAアッセイ試薬はベクトンディッキンソン（Becton Dickinson）TSH MAb [I¹²⁵] 固相キットから得た。このアッセイは以下の方法により実施した。

【0068】甲状腺刺激ホルモンMAb [I¹²⁵] 固相成分システム

血清または血漿中のヒト甲状腺刺激ホルモン（TSH）の定量測定を示す。

【0069】アッセイ方法

以下のプロトコルにおいては、標準試料および患者試料を2通りに作成して実施しなければならない。対照血清は患者試料と共に同時に実施すべきである。標準曲線および臨床的測定は同時に実施しなければならない。

【0070】すべての試薬および試料は使用前に室温にしなければならないが、より長い時間この温度に放置す

チューブ	標準	患者の
番号	(μ l)	血清 (μ l)
1, 2	200 A	—
3, 4	200 B	—

0. 1 14. 2 (2回の実験)
0. 1 27. 8 (3回の実験)

ングの効果

実施例1（I）に記載された方法にしたがって、1. 0 mlの二次抗体（2 μ g/mlのRAGGIG）で24時間チューブを前コートし、次にヒツジ抗ヒトTSH- β 2である一次抗体1. 0 mlをコートした。上記のとおり、1% BSAおよび5%デキストロースの存在または不在下でチューブをコートした。実施例1（II）に記載されたとおりに、このチューブをアッセイに使用し、そしてダイナミックレンジを測定した。結果を表2に示す。

【0066】【表2】

表2

コート法	ダイナミックレンジ
A. 前コート/コート/リンス (BSAなし)	15. 1
B. 前コート/コート/後コート	14. 2
C. 前コート/コート (BSAなし)	13. 0
D. 前コート/BSAでコート	27. 8

することは必要でない。洗浄工程には滅菌蒸留水を使用することが望ましい。

【0071】1. データ約分（reduction）技術が全カウントを必要とするならば、2つのポリスチレンチューブを標識し、そして取っておく。

【0072】2. 標準曲線に関して、1-14のナンバーを抗体でコートされたチューブに付し、各臨床試料および対照試料に関して2通りをアッセイする。

【0073】3. 200 μ lのTSH標準および臨床試料をチューブに加える。

【0074】4. すべてのチューブに500 μ lのTSHトレーサー溶液を加える。簡単に渦巻き攪拌する。チューブをカバーする。

【0075】5. 37 ± 1°Cにおいて水中で3. 0時間インキュベートする。

【0076】6. 水浴から全部のチューブを取り出してカバーを取る。

【0077】7. 吸引またはデカントする。2. 0 mlの蒸留水を加える。

【0078】8. 工程7を繰り返す。最終的に吸引またはデカントする。

【0079】9. これらチューブの放射性をカウントし、そしてガンマカウンターで1分間全チューブをカウントする（必要であれば）。

【0080】

チューブ	標準	患者の	トレーサー	インキュベート	洗浄
番号	(μ l)	血清 (μ l)	(μ l)	—	—
1, 2	200 A	—	500	—	—
3, 4	200 B	—	500	全チューブを	全カウント

11

12

5, 6	200 C	—	500	37 °Cにおいて	の場合以外
7, 8	200 D	—	500	3. 0時間	2回
9, 10	200 E	—	500	渦巻き攪拌	全チューブ
11, 12	200 F	—	500	および	を吸引
13, 14	200 G	—	500	インキュベート	および洗浄
対照及び				する	する
患者試料		200	500		

結果の計算自動計算

自動データ約分技術を使用することにより T S H の結果を計算してよい。点対点の書き入れ、4パラメーター算定曲線適合または他の種の曲線適合プログラムを利用してもよい。

【0081】マニュアル計算

1. チューブ 1-2 に関して平均 c p m を計算する。標準 A。

【0082】2. 他の続くチューブの c p m 各々からチューブ 1-2 の平均 c p m を差し引いて正確な c p m を得る。

【0083】3. 対数対数グラフを用いて、y 軸に各標準レベルの補正された c p m をとり、x 軸に標準濃度を取って標準曲線をプロットしてよい。

【0084】この結果を表3に示す。

【0085】

【表3】

表3

1分あたりのカウント

T S H 濃度 [μIU/ml]	R I A チューブ	新しいチューブ
0. 00	602. 7	259. 7
0. 22	790. 5	490. 0
1. 04	1558. 0	1134. 0
3. 71	4330. 0	3503. 0
8. 38	9005. 0	7662. 0
35. 50	23350. 0	24445. 0
97. 00	40536. 0	42014. 0

精度

RIATRAC 1	3. 81 μIU	3. 1
0 μIU		
RIATRAC 2	7. 81 μIU	7. 8
1 μIU		
RIATRAC 3	26. 24 μIU	28. 9
7 μIU		

RIA アッセイ試薬

RIA チューブ: BD AN 1948A

RIA トレーサー: RIA AN 2228

RIA 標準: AN 1505

この結果から、RIA トレーサーをアッセイに使用して本発明の方法によりコートされたチューブを利用することができる事が示される。

【0086】実施例4非精製一次抗体を用いた競争アッセイ

腹水中のモノクローナル一次抗体をポリクローナル一次抗体の代わりに用い、そして一次抗体をコーティング前に精製しないこと以外は、実施例1 (1) (D) に記載されているとおりにチューブをコートした。

【0087】このアッセイに使用したチューブは標準コーティング法および新しい2段階法により調製した。標準コーティング法のコーティング緩衝液は 100 mM リン酸 (pH 7. 5) であり、モノクローナル抗体を含む

腹水液体をこれで希釈した。力価は 1/10, 000 であった。チューブは加工される前に 1. 0 ml の抗体溶液で 24 時間コートされた。新しいコーティング法においては、1. 0 ml の 1/500, 000 MAb 含有腹水液体でコートする前に、チューブを最初に 2 μg/ml の GAM IgG、Fc 特異的なもので前コートした。

【0088】競争フォーマットを用いて T の吸収に関する非アイソトープリポソームアッセイにチューブを使用した。この甲状腺吸収 (T 吸収) 試験法においては、固定量のチロキシンおよびチロキシン結合リポソームをアッセイ緩衝液中に存在させる。標準コートおよび新しい前コートコート法を用いて抗-T₄モノクローナル抗体 (MAb) をアッセイチューブにコートした。MAb はリポソーム結合体およびチロキシンの両方を結合することができる。T BG を含む結合蛋白質は参考の標準の血清中に存在し、そして未知のものがチロキシンに結合するが、チロキシンリポソームには結合しない。結合しないまま血清中に残ったチロキシンの量はチューブ上の抗体に関してリポソームと競争する。未知の血清 T BG の結合能力が参考の標準のそれより低いならば、チロキシンの吸収はリポソームに代わってより高くなる。

【0089】インキュベート後、チューブを洗浄してあらゆる非特異的結合リポソームを除去し、そして界面活性剤溶液を使用してリポソーム膜をこわし、それにより

蛍光染料を放出した。蛍光はフルオロメーターにより測

$$\text{吸収(未知)} = \frac{\text{シグナル(Ref)} - \text{シグナル(Blank)}}{(\text{Ref}) - \text{シグナル(UNK)}} * \text{吸収}$$

競争アッセイフォーマットを用いたT吸収に関する非ア

イントーブリポソームアッセイ

アッセイ緩衝液 0.1M リン酸、pH 7.4
0.14M 塩化ナトリウム
0.04% サリチル酸
0.05% BSA
0.25% $\mu\text{g T}_4$ スパイク
リポソーム ベクトンディッキンソンアドバンスト
ダイアグノスティック (Becton Dickinson
on Advanced Diagnostics)、ロ
ット# 1065-32-2 (力値1/100)

アッセイ法

1. コートされたポリプロピレンチューブに $25\mu\text{l}$ の試料を加える。

【0090】2. コートされたチューブに $1000\mu\text{l}$ のトレーサーを加える。

【0091】3. 2から3秒間すべてのチューブを渦巻き攪拌する。

【0092】4. 45度において30分間反応混合物をインキュベートする。

【0093】5. インキュベート完了後反応混合物を吸

定し、そして吸収値は以下の式により測定した：

$$\text{吸収} = \frac{\text{シグナル(Ref)} - \text{シグナル(Blank)}}{(\text{Ref}) - \text{シグナル(UNK)}} * \text{吸収}$$

引する。

【0094】6. ブリンクマンリピペッター (Blink man repipettor) を用いてチューブに 5mI の洗浄溶液を加える。

【0095】7. チューブから洗浄溶液を吸引する。

【0096】8. 2回以上工程6および7を繰り返す。

【0097】9. 洗浄されたチューブに 2mI の溶解溶液を加える。

【0098】10. 溶液含有チューブを激しく渦巻き攪拌する。

【0099】11. 5分間待ち、再び渦巻き攪拌する。

【0100】12. フルオロメーターにより蛍光を測定する。

【0101】アッセイの要約

試料サイズ $25\mu\text{l}$
トレーサー体積 $1000\mu\text{l}$
インキュベート時間 30分間
混合速度 一定

結果を表4に示す。

【0102】

【表4】

表4

T吸収競争アッセイにおいて評価された

前コート/コートチューブおよび標準コートチューブ

コーティング法	標準コート		前コート/コート
	一次抗体力値	$1/10,000$	
T_4 の $\mu\text{g}/\text{mI}$	蛍光ユニット		
0.0	6258.0	6416.5	
0.5	4423.5	5666.0	
2.0	4258.5	4288.0	
4.0	3540.0	3663.0	
8.0	3122.0	3194.0	
32.0	2438.5	2736.5	

この結果が示すことは、等しい応答のために必要な抗体の量は、新しいコーティング法を用いた場合、50倍減少したことである。

【0103】実施例5-8

前コートおよびコート工程の条件は、アッセイの応答への影響を測定するために変更された。条件は各実施例においてまとめられ、そして結論は以下の各実施例に要約

されている。コートされたチューブは実施例1 (I) (D) にしたがって調製され、そして実施例1のアッセイ法の原理に記載されている方法にしたがってアッセイされた。アッセイ成分は実施例1に記載されている成分／処方の記載の部分に記載されている。

【0104】実施例5

異なる二次抗体を用いた前コーティング

チューブ上の抗体	源
GAH TSH	一次抗体 Ventrex
RAGGIG	二次抗体 Jackson Immunoresearch
GAH TSH	一次抗体 OEM (A. P.)
RAGGIG	二次抗体 Jackson Immunoresearch
RAH TSH	一次抗体 Ventrex

G A R G I G	二次抗体	Jackson Immunoresearch
R A H T S H	一次抗体	O E M (A. P.)
G A R G I G	二次抗体	Jackson Immunoresearch

【表5】

表5

二次抗体	一次抗体	抗体 [$\mu g/ml$]	ダイナミックレンジ
R A G G I G	V e n t r e x ヒツジ	[1. 00]	9. 7
"	"	[0. 50]	8. 7
"	"	[0. 25]	9. 1
G A R G I G	V e n t r e x ウサギ	[1. 00]	8. 5
"	"	[0. 50]	8. 9
"	"	[0. 25]	13. 2
R A G G I G	O E M ヒツジ	[0. 20]	17. 0
"	"	[0. 10]	16. 0
"	"	[0. 05]	13. 2
G A R G I G	O E M ウサギ	[0. 20]	13. 2
"	"	[0. 10]	11. 0
"	"	[0. 05]	8. 6

R A G G I G または G A R G I G からなる前コートは 2 つの異なる一次抗体に対して各々コートされた。コート 20 緩衝液は 1 % B S A および 5 % デキストロースを含む 1 0 0 mM リン酸ナトリウム (p H 7. 45) からなった。リポソーム上の抗体はベクトンディッキンソン (B e c t o n D i c k i n s o n) リサーチセンター、

クローン 291 により供給される M A H T S H であつた。

【0105】観察

すべての 4 つの抗体の組み合わせは変位 (d i s p l a c e m e n t) を与えた。

【0106】実施例 6

新しい前コート法を用いた低濃度の一次抗体の応答

チューブ上の抗体

記載	種類
G A H T S H	一次抗体
R A G G I G ; 2 $\mu g/ml$	二次抗体
リポソーム上の抗体	
M A H T S H	

【表6】

表6

P A b [$\mu g/ml$]	ダイナミックレンジ
0. 050	12. 5
0. 025	12. 0
0. 020	11. 5
0. 010	10. 7
0. 005	6. 9

観察

1 0 n g / チューブの一次抗体で前コートされたチューブは適度の変位を与えた。対象的に、標準コート法によ

りコートされたチューブは 1 0 0 × 高い濃度においてわずかに変位を与えた。

【0107】実施例 7

I. 一次抗体の濃度、およびコート緩衝液の pH およびイオン強度の変化

チューブ上の抗体

記載	種類
G A H T S H	一次抗体
R A G G I G	二次抗体
リポソーム上の抗体	
M A H T S H	
前コート緩衝液	

100mMリン酸 (pH 7.45) 中の $2 \mu\text{g}/\text{ml}$ RAGGIG

【表7】

表7

コート緩衝液	PAb [$\mu\text{g}/\text{ml}$]	コート緩衝液 pH	
		pH 8.0	pH 7.45
500mM リン酸	0.20	15.0	14.7
250mM リン酸	"	17.9	14.8
100mM リン酸	"	17.4	17.8
500mM リン酸	0.10	13.3	9.5
250mM リン酸	"	17.8	9.2
100mM リン酸	"	20.3	10.7
500mM リン酸	0.05	17.2	13.6
250mM リン酸	"	10.1	10.4
100mM リン酸	"	12.1	12.4

観察

抗体濃度の変化はコート緩衝液のイオン強度およびpHの変化に非感受性であった。pH 8.0のコート緩衝液

はこれらの条件下でpH 7.45の緩衝液よりも良好なダイナミックレンジを与える。

【0108】

I I. コート工程のpH、イオン強度、およびカウンターイオンの変化
チューブ上の抗体

記載	種類
GAH TSH、[0.20]	一次抗体
RAGGIG；[2.0]	二次抗体
リポソーム上の抗体	
MAH TSH	

【表8】

表8

コート緩衝液	mM濃度	pH	ダイナミックレンジ
リン酸	1.0	7.45	14.3
"	1.00	"	15.1
"	3.00	"	17.9
"	5.00	"	15.2
リン酸	3.00	6.75	12.4
"	"	8.50	10.1
グリシン	3.00	9.60	6.1

観察

チューブのダイナミックレンジはコート緩衝液のpH 6.75からpH 8.50への変化、および1.0mMと5.00mMの間のイオン強度の変化には相対的に非感受性であるらしい。

【0109】この抗体には3.00mMグリシン (pH 9.6) は好ましいコート緩衝液ではないが、以下に示すように他の条件下では他の抗体を用いて満足な結果が得られる。

【0110】実施例8

グリシン前コートにおける二次抗体濃度の変化および

共コートのイオン強度の変化

チューブ上の抗体

記載	種類
GAH TSH、[0.20]	一次抗体
RAGGIG；[2.0]	二次抗体
リポソーム上の抗体	
MAH TSH	

【表9】

表9

前コート 緩衝液	抗体 コート			P A b ダイナミック				
	mM	pH	[μ g/ml]	緩衝液	mM	pH	[μ g/ml]	レンジ
グリシン	300	9.6	[1.0]	リン酸	100	7.45	0.2 μ g/ml	15.3
"	"		[2.0]		"			15.0
"	"		[1.0]	リン酸	10	7.45	0.2 μ g/ml	15.5
"	"		[2.0]		"			15.1

観察

リン酸緩衝液を用いた標準前コートに加えて、チューブの応答は 300 mM グリシン (pH 9.6) 中の 1 または 2 μ g/ml の二次抗体の前コートの使用およびリン酸コート緩衝液のイオン強度の変化により満足な結果が得られる。

【0111】本発明の好ましい態様が何であると信じられているかを記載してきたが、当業者であれば本発明の精神から離れることなく変化および修飾を行ってよいことは認識できるであろうし、またすべてのそのような変化および修飾は真に本発明の範囲内のものとして請求されるよう意図される。

フロントページの続き

(72)発明者 ルイス・アール・ポーラック
アメリカ合衆国ニューヨーク州10471, リ
ヴァーデール, ジョンソン・アベニュー
3135